

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 15 年度採択研究代表者

笹川 千尋

東京大学医科学研究所 感染・免疫部門・教授

病原細菌の粘膜感染と宿主免疫反応抑制機構の解明とその応用

## 1. 研究実施の概要

本研究は、赤痢菌をモデルとして病原細菌の腸粘膜感染における普遍的な感染戦略を解明するとともに、その知見を赤痢ワクチンや感染モデル動物の開発へ資することを目的とした。具体的には、赤痢菌の腸上皮バリアーへの侵入から感染の成立に至る過程 III 型分泌装置より分泌される一群のエフェクターと、その標的宿主因子および細胞機能との相互関係を明らかにするとともに、本研究で開発したモルモット腸管感染モデルを利用してそれら因子の腸管感染に果たす役割を精査した。その結果、感染初期に最も重要な本菌の上皮細胞侵入に中心的な役割を示すエフェクターを同定し、また粘膜上皮細胞のターンオーバーを抑制して菌の定着を促進する新規な感染戦略を明らかにした (Iwai et al. Cell 2007)。さらに、炎症・免疫誘導を抑制するエフェクターとともに、抗原提示細胞の細胞死を促進するエフェクターを同定し、それらの細胞内における機能を解明した。これらの知見により本菌のあらたな感染戦略が明らかとなった。今後、感染初期に動員される新規エフェクターの役割を、細胞生物学的手法および動物感染モデルを用いて精査し、赤痢菌の感染初期戦略を包括的に理解する。

## 2. 研究実施内容

### 赤痢菌エフェクターの上皮細胞内動態と感染における役割の研究

感染初期に上皮細胞へ分泌されるエフェクターの一つ、IpgB1 は宿主細胞の RhoG 活性を擬態し、RhoG の標的である ELOMO へ特異的な結合性を示した。IpgB1 の ELMO への結合により ELMO-DOCK180-Rac1 経路が活性化され、大規模なラッフル膜形成と菌の細胞侵入が著しく増大した (Handa et al. Nat Cell Biol, 2007)。IpgB2 は、IpgB1 と部分的な相同性を示すエフェクターとして IpgB1 とともに III 型分泌装置を通じて上皮細胞へ分泌される。IpgB2 は、mDia および Roch

と結合して RhoA を活性化することが他の研究者より報告されていたが、感染における役割は不明であった。本研究では、IpgB2 による RhoA 活性化を確認するとともに、IpgB2 の過剰発現が菌の細胞侵入およびラッフル膜形成に対して負に作用することを見いだした。また、IpgB1 と IpgB2 は、菌の侵入後に速やかにプロテアソーム依存的な分解を受け、その分解は菌の円滑な細胞侵入に重要であることが明らかとなった。今後、IpgB1 と IpgB2 のプロテアソーム依存的な細胞内分解機構と赤痢菌の細胞侵入における生物学的意義を明らかにする。

#### 赤痢菌エフェクターによる免疫抑制機構の研究

赤痢菌の上皮細胞内増殖に伴いオートファジーおよび炎症シグナルが活性化される。しかし赤痢菌は IcsB エフェクターを細胞内で分泌しオートファジーを回避する。本菌に対するオートファジーの認識機構と IcsB による回避機構を他の菌と比較する目的で、本菌と同様に細胞質内で増殖しアクチン重合を誘導して移動するリステリア (*Listeria monocytogenes*) のオートファジー回避機構を精査した。その結果、リステリアでは、菌体の細胞壁がオートファジーの標的となること、またアクチン重合を誘導するために必須な本菌の ActA タンパク質が菌体表面に存在することがオートファジー回避に不可欠であった。しかし、ActA のオートファジー回避能は、ActA のアクチン重合誘導活性には依存しなかった。したがって、赤痢菌とリステリアでは異なる機序によりオートファジー回避が行われていることが示唆された (論文投稿中)。一方赤痢菌の III 型分泌装置より少なくとも 9 種類の IpaH ファミリーが細胞内で分泌されていることを報告した (Ashida et al. *Mol Microbiol*, 2007)。また IpaH9.8 が E3 リガーゼ活性を持つことが他の研究者より示された。そこで IpaH ファミリーについて E3 リガーゼ活性を調べた結果、すべての IpaH に E3 リガーゼ活性が認められた。今後、各 IpaH の E3 リガーゼの標的となる宿主タンパク質とそのシグナル経路を解明し、炎症抑制に関わる IpaH を同定しその炎症抑制機構を明らかにする。

#### 赤痢菌腸管感染モデル動物開発の試み

赤痢菌を、遺伝学的背景を異にするマウスの腸管へ経口的に投与し、腸管での菌の自然感染の有無を精査したが、いずれのマウスにおいても感染は認められなかった。これに替わって、Mina らのグループ (ソウル、International Vaccine Institute) との共同研究でモルモット直腸感染モデルを開発した (*J Immunol*, 2007)。本モデルは種々の赤痢弱毒変異株に対する感受性試験でも極めて再現性よく病原性を反映することが示された。そこで今回あらたに同定した新規エフェクター欠損株と野生株を用いて、本感染モデルの有効性を検証した。いずれの場合も、当該エフェクター欠損株の腸管組織内定着率および腸管炎症誘導の程度は野生株に比べ有意に低下しており、本モデルの有用性がさらに確認された。

#### 赤痢菌の抗原提示細胞死誘導機構の解明とその応用

赤痢菌は感染初期にマクロファージへ侵入し pyroptosis 様の細胞死を誘導する。今回、IpaH ファミリーのひとつとしてあらたに同定した IpaH (IpaH-n) は、マクロファージ細胞死を促進する活性を

有することを見いだした。赤痢菌野生株、*ipaH-n* 欠損株、および *ipaH-n* 過剰発現株をマクロファージへ感染させ細胞死誘導能を調べたところ、IpaH-n 依存的な pyroptosis 様細胞死が認められた。本 IpaH-n は、他の IpaH ファミリーと同様に E3 リガーゼ活性を持ち、またプロテアソーム依存的な細胞死を誘導することから、今後、IpaH-n の標的分子を同定し、感染初期における赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導の分子機構解明を目指す。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「笹川千尋」グループ

- ①研究者名：笹川 千尋(東京大学医科学研究所、教授)
- ②研究項目：赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究  
免疫抑制に関わるエフェクターの研究  
赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

1. Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., Muller, D., Kirikae, T., Jackson, P.K., Kotani, S., and Sasakawa, C. A Bacterial Effector Targets Mad2L2, an APC Inhibitor, to Modulate Host Cell Cycling. *Cell* 130, 611-623 (2007)
2. Mimuro, H., Suzuki, T., Nagai, S., Rieder, G., Suzuki, M., Nagai, T., Fujita, Y., Nagamatsu, K., Ishijima, N., Koyasu, S., Haas, R., and Sasakawa, C. *Helicobacter pylori* Dampens Gut Epithelial Self-Renewal by Inhibiting Apoptosis, a Bacterial Strategy to Enhance Colonization of the Stomach. *Cell Host & Microbes* 2, 250-263 (2007)
3. Iizumi Y., Sagara H., Kabe Y., Azuma M., Kume K., Ogawa M., Nagai T., Gillespie P. G., Sasakawa C., and Handa H. The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host & Microbe* 2, 383-392 (2007)
4. Nagai, S., Mimuro, H., Yamada, T., Baba, Y., Moro, K., Nochi, T., Kiyono, H., Suzuki, T., Sasakawa, C., and Koyasu, S. Role of Peyer's patches in the induction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8971-8976 (2007)
5. Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., and Nunez, G. Differential Regulation of Caspase-1 Activation,

Pyroptosis, and Autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-Infected Macrophages. *PLoS Pathog.* 3, e111 (2007)

(2) 特許出願

平成 19 年度国内特許出願件数： 0 件 (CREST 研究期間累積件数： 2 件)